한국동물분류학회지 제13권 제1호
The Korean Journal of Systematic Zoology
Vol. 13, No. 1: 29-36 (March 1997)

기름종개과(Family Cobitidae) 어류의 계통분류에 관한 연구 8. *Cobitis taenia* complex mtDNA의 유전적 분화와 분류학적 위치

김 재 흡 · 민 미 숙 · 김 종 범 · 양 서 영
(인하대학교 이과대학 생물학과)

적 요

한국산 기름종개속 어류중 *Cobitis taenia* complex의 집단간 유전적 차이에 따른 종분화 여부를 밝히고자 6개집단을 대상으로 mitochondrial DNA(mtDNA)의 RFLP 분석을 실시하였다. *C. taenia* complex mtDNA를 10개의 6-base cutting 제한효소로 처리한 다음 그 절편양상을 비교, 분석한 결과 6개 집단 공히 mtDNA의 전체 genome 크기는 약 17.0±0.5 Kbp 였으며 공동절편수(F)에서 *C. t. taenia* 2개집단과 *C. t. striata*와 *C. t. lutheri* 4개집단간의 F값은 평균 0.263으로 차이가 있었으나, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri* 사이는 F=0.569로 가깝게 나타났다. 염기치환율(*p*)에 있어 *C. t. taenia*는 *C. t. striata* 및 *C. t. lutheri*와 평균 *p*=0.082로 뚜렷한 종간차이를 보였으나, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri* 집단들은 *p*=0.033으로 매우 가까운 유사성을 나타내었다. MtDNA 분석결과 *C. taenia* complex중 *C. t. taenia*는 완전히 종분화가 이루어진 별종으로, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*는 아직 종수준의 분화가 이루어지지 않은 아종으로 분류함이 타당하다고 사료된다.

Key words: speciation, Cobitidae, *Cobitis taenia* complex, mtDNA RFLP

서 론

자연집단의 분류에는 형태적 특징이외에 행동학적, 세포생물학적, 생화학적 및 분자생물학적 특징등 생물체가 가지는 다양한 분류학적 형질을 이용한 종합적인 연구가 수행되며, 이러한 여러 형질들중 분자수준에서의 mitochondrial DNA(mtDNA) RFLP 분석은 종 및 집단의 유전적 특징을 반영하므로 근연종의 계통 및 진화단계를

* 본 연구는 1993년도 교육부 기초과학육성연구비 지원(BSRI 93-121) 및 인하대학교 박사후 과정 연구원 연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

분석하는데 매우 유용하다. 척추동물의 mtDNA는 대부분 그 크기가 15.7-23.0 Kbp이며(Brown, 1983; Lansman *et al.*, 1983; Kessler and Avise, 1985) 모계 유전물질로 비암호 서열 부위가 존재하지 않아 재조합 현상이 일어나지 않는 특징을 가지므로 유전적 표식인자로서의 중요성이 인식되어, 최근에는 mtDNA 분석방법을 이용한 계통진화 연구가 어류(Raicu and Taisescu, 1972; Hartley and Horne, 1982; Lee *et al.*, 1984; Gyllensten *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1988, 1989), 양서류(Green, 1983; Spolsky and Uzzel, 1984; Carr *et al.*, 1987), 파충류(Bogart, 1980)등의 다양한 분류군을 대상으로 활발히 진행되고 있다.

한국산 기름종개과 기름종개속의 *Cobitis taenia* complex에 속하는 기름종개(*C. t. taenia*), 줄종개(*C. t. striata*), 점줄종개(*C. t. lutheri*)등은 분포 및 형태적 특징에 따라 아종으로 분류되었으나(Kim, 1980), Kim과 Jeong(1987)은 *C. t. taenia*를 중국산 *C. sinensis*의 synonym으로, Kim과 Lee(1988)는 *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*를 생리적 차이에 따른 성적이형현상의 유무, 골질반의 구조등의 차이를 들어 별종으로 재분류한 바 있다. 그러나 Yang 등(1993)은 *C. taenia* complex에 대한 형태, 동위효소 분석 및 과거 연구보고된 핵형(Lee *et al.*, 1986), 자연잡종(Kim and Yang, 1993) 및 형태(Kim and Lee, 1984)등의 비교분석결과 *C. t. taenia*는 별종으로, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*는 아종으로 분류함이 타당하다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 *C. taenia* complex에 속하는 *C. t. taenia*, *C. t. striata* 및 *C. t. lutheri*등의 6개 집단을 대상으로 mtDNA RFLP 분석을 실시하여 이들의 분류학적 위치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 필요한 실험재료는 6개집단 총 82개체를 채집하여 mtDNA 분석에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Collection localities, dates and number of specimens of the *Cobitis taenia* complex.

Locality	Collection date	No. of specimens
Cobitis taenia		
1. Sangju : Kyungsangbuk-do, Sangjoo-gun, Konggum-myon	May 8, 1993	12
2. Sanchong : Kyungsangnam-do, Sanchong-gun, Sindeung-myon	May 7, 1993	15
C. t. lutheri		
3. Yongam : Jollanam-do, Yongam-gun, Yongam-myun	May 5, 1993	13
4. Miho : Chungchongbuk-do, Chongwon-gun, Ochang-myon	Sep. 15, 1992	14
C. t. striata		
5. Kwangyang : Jollanam-do, Kwangyang-gun, Kwangyang-up	Jun. 26, 1992	14
6. Sachon : Kyungsangnam-do, Sachon-gun, Sachon-up	May 6, 1993	14

MtDNA는 Bernatchez와 Dodson(1990)의 방법에 따라 생체의 간, 신장 및 심장으로 부터 분리추출하였고, 각 개체별 조직의 양이 적어 동일집단 개체들의 조직을 합하여 총 1.5-2.0 gr 정도의 양을 추출하였다. MtDNA는 6개의 염기를 인식할 수 있는 10가지의 제한효소(*Ava* I, *Bgl* I, *Cla* I, *Eco* RI, *Xba* I, *Bam* HI, *Hin* dIII, *Pst* I, *Bcl* I and *Pvu* II)를 각각 처리한 후, 0.8%의 agarose gel로 전기영동하고 ethidium-bromide로 염색하여 제한효소별 절편양상을 확인, 분석하였다. Nei와 Li(1979)의 공식을 이용하여 각 집단의 mtDNA절편이동도에 따라 비교되는 집단간 공통절편수의 비율(F값)을 얻고 이 F값을 이용하여 각 염기치환율(p)을 산출하였다.

결 과

C. taenia complex 6개집단의 mtDNA를 제한효소로 처리하여 얻어진 절편분석결과 각 제한효소별 절편수는 0-4개로 다양하였고(Fig. 1, Table 2), 전 제한효소에서는 총 50가지의 절편이 분석되었으며, 각 집단별로는 *C. t. taenia* 22개, *C. t. lutheri*는 27개, 그리고 *C. t. striata*는 24개의 절편을 갖는 것으로 나타났다. MtDNA의 크기는 약 17.0±0.5 Kbp로서 제한효소별 집단간 크기차이는 없었다.

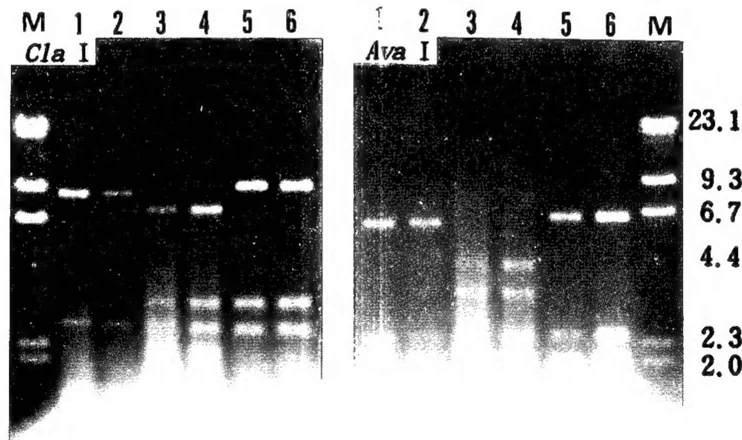


Fig. 1. Fragment patterns produced by *Cla* I and *Ava* I digestion of mtDNA of the *Cobitis taenia* complex. Numbers (1 through 6) refer to the populations listed in Table 1.

제한효소를 처리하여 얻어진 절편분석 결과 *C. t. lutheri* 미호천 집단은 *Cla* I에서 5개의 절편을 가지며 집단내 변이를 보였다. 그러나 *C. taenia*와 *C. t. striata*는 집단간 및 집단내 변이가 없었다. 각 집단간 공통절편수에 있어 *C. t. lutheri* 영암집단과 *C. t. striata* 2집단과는 공통절편이 15개, 미호천 집단과 *C. t. striata* 집단들은 14개의 공통절편을 가지며, *C. t. taenia* 산청집단은 타 집단들과 6-7개의 공통절편만을 갖는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 2. Estimated number of mtDNA fragments of the *Cobitis taenia* complex.

Species	Population	N	Restriction enzymes										
			Bam HI	*Ava* I	*Pst* I	*Eco* RI	*Pvu* II	*Xba* I	*Hin* dIII	*Bcl* I	*Cla* I	*Bgl* I	Total
C. taenia	1. Sangju	12	0	3	3	2	2	2	3	3	3	1	22
	2. Sanchong	15	0	3	3	2	2	2	3	3	3	1	22
C. t. lutheri	3. Yongam	13	0	4	2	3	2	3	4	4	4	1	27
	4. Miho	14	0	4	2	3	2	3	4	4	4	1	27
C. t. striata	5. Kwangyang	14	1	3	2	3	2	4	4	2	3	0	24
	6. Sachon	14	1	3	2	3	2	4	4	2	3	0	24

Table 3. Shared number of mtDNA fragments among the populations of *Cobitis taenia* complex.

Population	Restriction enzymes										
	Bam HI	*Ava* I	*Pst* I	*Eco* RI	*Pvu* II	*Xba* I	*Hin* dIII	*Bcl* I	*Cla* I	*Bgl* I	Total
1-2	0	3	3	2	2	2	3	3	3	1	22
1-3	0	2	0	0	0	1	1	1	1	1	7
1-4	0	2	0	0	0	1	1	0	1	1	6
1-5	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	6
1-6	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	6
2-3	0	2	0	0	0	1	1	1	1	1	7
2-4	0	2	0	0	0	1	1	0	1	1	6
2-5	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	6
2-6	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	6
3-4	0	4	2	3	2	3	4	3	4	1	26
3-5	0	2	2	2	0	2	4	1	2	0	15
3-6	0	2	2	2	0	2	4	1	2	0	15
4-5	0	2	2	2	0	2	4	0	2	0	14
4-6	0	2	2	2	0	2	4	0	2	0	14
5-6	0	3	2	3	2	4	4	2	3	0	24

이들 공통절편수를 토대로 Nei와 Li(1979)의 공식에 의해 공통절편의 비율(F값)과 염기치환율(p값)을 측정한 결과 *C. t. taenia-C. t. striata*는 F=0.261, p=0.082, *C. t. taenia-C. t. lutheri*는 F=0.265, p=0.081로 *C. t. taenia*는 타 종들과 비교적 차이가 뚜렷하였으나, *C. t. striata-C. t. lutheri*는 F=0.569, p=0.033으로 근연관계가 가까왔다(Table 4).

Table 4. Estimates of mtDNA fragment homology (F value, above diagonal) and sequence divergence (*p* value, below diagonal) of the *Cobitis taenia* complex.

	Population					
	1	2	3	4	5	6
Cobitis taenia						
1. Sangju	-	1.000	0.286	0.245	0.261	0.261
2. Sanchong	0.000	-	0.286	0.245	0.261	0.261
C. t. lutheri						
3. Yongam	0.076	0.076	-	0.963	0.588	0.588
4. Miho	0.086	0.086	0.002	-	0.549	0.549
C. t. striata						
5. Kwangyang	0.082	0.082	0.031	0.035	-	1.000
6. Sachon	0.082	0.082	0.031	0.035	0.000	-

고 찰

C. taenia complex에 대한 mtDNA RFLP 분석결과 *C. t. taenia*와 *C. t. striata* 및 *C. t. lutheri*의 염기치환율(*p*)은 *C. t. taenia*-*C. t. striata*가 0.082, *C. t. taenia*-*C. t. lutheri*가 0.081, 그리고 *C. t. striata*-*C. t. lutheri*가 0.033으로 나타났다. 염기치환률이 100만년 마다 약 1%가 발생한다는 경우를 인정할 경우(Brown, 1985; Wilson *et al.*, 1985) *C. t. taenia*는 타 종들과 약 400만년전에, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*는 약 160만년전에 분화된 것으로 산출된다.

한편 mtDNA의 절편양상에 있어 제한효소에 의한 종내 집단간 및 집단내 변이는 일반적인 현상으로(Lee and Park, 1991, 1992) 기름종개속의 *C. koreensis* 와 *C. rotundicaudata* 등에서도 많은 변이가 발견되었다(Yang and Kim, 1995; Kim *et al.*, 1997). 그러나 *C. taenia* complex의 경우는 상기의 2종에 비하여 변이정도가 매우 낮았다.

염기치환율에 의한 종간 비교에서 기름종개과 어류의 미꾸리속(genus *Misgurnus*) 2종의 종내 집단간 염기치환율은 미꾸리의 경우 *p*=0.021, 미꾸라지는 *p*=0.002로 낮은 치환율을 보였으나, 종간에는 *p*=0.104로 차이가 있었다(Lee *et al.*, 1994). 또한 기름종개속의 참종개(*C. koreensis*)의 경우 종내 집단간은 *p*=0.012(Yang and Kim, 1995)로 낮았고, 타 어종인 *Clupea harengus*는 *p*=0.029(Kornfield and Bogdanowitz, 1987), 투구게의 일종인 *Limulus polyphemus*에서도 *p*=0.020으로 종내 집단간 염기치환율은 일반적으로 *p*=0.030이하로 나타난다. 그러나 종간 염기치환율에서 미꾸리와 미꾸라지는 종간 *p*=0.104(Lee *et al.*, 1994), 양서류의 두꺼비와 물두꺼비는 *p*=0.073(Lee and Park, 1992)으로 분류군에 따라 다소 차이가 있으나 종간에는 평균 *p*=0.070 이상의 염기치환율을 보이고 있어, 본 연구에서 나타난 *C. taenia*와 타 2종과의 치환율(0.081-0.082)은 이들의 분류학적 관계가 완전한 종분화가 이루어진 별종

임을 시사한다. 그러나 *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*간의 염기치환율(p=0.033)은 집단간 치환율인 3% 수준과 거의 유사하게 나타나고 있어 이들은 아직 종분화가 이루어지지 않았음을 시사하며 또한 이들 사이에 자연잡종이 생기는 점으로 보아 아종 수준의 분화가 되었음을 나타낸다(Kim and Yang, 1993). 상기의 결과는 Yang 등(1993)의 전기영동법을 이용한 동위효소분석의 선행연구에서도 *C. t. taenia*는 *C. t. striata* 및 *C. t. lutheri*와 유전적 근연치에 있어 S=0.64로서 일반적인 어류의 종간 근연치를 나타내는 반면, *C. t. striata*와 *C. t. lutheri*간에는 S=0.82정도의 유전적 근연치로 아종수준의 근연치를 나타낸다는 보고와 잘 일치한다.

본 연구결과와 선행연구자료들을 종합하여 볼때 *C. taenia* complex에 속한 종들의 경우 Yang등(1993)이 보고한 바와 같이 *C. taenia*는 독립된 별종으로 *C. t. striata* 와 *C. t. lutheri*는 아종으로 분류함이 타당하다고 사료된다.

참고문헌

Bernachetz, L. and J. J. Dodson, 1990. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish(*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. Evolution **44**: 1263-1271.

Bogart, J. P., 1980. Polyploidy in evolution of amphibians and reptiles. In: Polyploidy; Biological relevance (H. L. Lewis, eds.). Plenum Press New York, pp. 341-369.

Brown, K. L., 1985. Demographic and genetic characteristics of dispersal in the mosquitofish, *Gambusia affinis* (Pisces: Poecillidae). Copeia **1985**: 597-612.

Brown, W. M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA, In: Evolution of genes and proteins, (Nei, M. and R. K. Koehn, eds.), Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 62-88.

Carr, S. M., J. A. Brothers and A. C. Wilson, 1987. Evolutionary inference from restriction maps of mitochondrial DNA from nine taxa of *Xenopus* frogs. Evolution **41**: 176-188.

Green, D. M., 1983. Evidence for chromosome number reduction and chromosomal homosequenciality in the 24 chromosome of Korean frog *Rana dybowskii* and related pecies. Chromosoma (Berl.) **88**: 222-226.

Gyllensten, U., R. F. Leary, F. W. Allendorf and A. C. Wilson, 1985. Introgression between two cuttrout subspecies with substantial karyotypic, nuclear and mitochondrial genomic divergence. Genetics **111**: 905-915.

Hartley, S. E. and M. T. Horne, 1982. Chromosome polymorphism in the rainbow trout(*Salmo gairdneri* Richardson). Chromosoma **87**: 461-468.

Kessler, L. G. and J. C. Avise, 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. Mol. Biol. Evol. **2**: 109-125.

Kim, I. S., 1980. A systematic study of the genus *Cobitis* from Korea. Ph.D. Dissertation, Chung Ang University.

Kim, I. S. and M. T. Jeong, 1987. *Cobitis sinensis*(Pisces, Cobitidae) from Nakdong river, Korean J. Zool., **30**: 71-78.

Kim, J. H., M. S. Min, J. B. Kim and S. Y. Yang, 1997. Systematic study on the fishes of the Family Cobitidae

(Pisces, Cypriniformes) 7. A study on mitochondrial DNA differentiation and speciation in Korean cobitid fish, *Cobitis rotundicaudata*. Korean J. Syst. Zool.(Submitted).

Kim, J. H. and S. Y. Yang, 1993. Systematic studies of the genus *Cobitis*(Pisces: Cypriniformes) IV. Introgressive hybridization between two spined loach subspecies of the genus *Cobitis*(Pisce, Cobitidae). Korean J. Zool. **36**: 535-544.

Kim, I. S. and W. O. Lee, 1984. Effects of stream modification in the Seomjin river on the fish communities of the Dongjin river. Bull. Korean Fish. Soc., **17**: 549-556.

Kim, I. S. and G. Y. Lee, 1988. Taxonomic study of the cobitid fish, *Cobitis lutheri* Rebdahl and *C. striata* Ikeda(Cobitidae) from Korea. Korean J. Syst. Zool. **4**: 91-102.

Kornfield, I. and S. M. Bogdanowitz, 1987. Differentiation of mtDNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*. Fish. Bull. **85**: 561-568.

Lansman, R. A., J. C. Avise, and M. D. Huettel, 1983. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**: 1969-1971.

Lee, H. Y. and C. S. Park, 1991. Systematic study on the fishes of the family Cobitidae (Pisces; Cypriniformes) : Extensive variation in mitochondrial DNA among geographic populations of *Nemacheilus toni*. Korean J. Ichthyol. **3**: 140-147.

Lee, H. Y. and C. S. Park, 1992. Genetic studies on Korean anurans : Mitochondrial DNA variation of asian toad (*Bufo bufo*) and water toad (*B. stejnegeri*). Korean J. Genetics **14**: 247-255.

Lee, H. Y., H. S. Lee, C. S. Park, 1986. Karyotype analysis and geographical polymorphism in Korean *Cobitis*. Korean J. Genetics **8**: 65-74.

Lee, H. Y., H. S. Lee, J. W. Cho and Y. O. Lee, 1984. The karyotype analysis on 21 species of fresh water fish in Korea(II). Bull.Inst. Basic Sci., Inha Univ. **5**: 125-140.

Lee, H. Y., S. Y. Yang, S. G. Paik, C. S. Park, S. L. Yu and S. K. Lee, 1988. A study on the speciation of a fresh water fish *Zacco temmincki*. VII. Variation of mitochondrial DNA between 2 types of *Z. temmincki*. Korean J. Zool. **31**: 263-242.

Lee, H. Y., S. Y. Yang, C. S. Chang, and C. S. Park, 1989. Evolutionary study on the Dark Chub(*Zacco temmincki*). VIII. Mitochondrial DNA analysis of the subfamily Danioninae (Pisces, Cyprinidae). Korean J. Genet. **11**: 175-187.

Lee, H. Y., S. Y. Yang, C. S. Park, E. K. Jung, and J. H. Kim, 1994. Systematic study on the family Cobitidae(Pisces, Cypriniformes) 4. The analyses of karyotype and mitochondrial DNA between the two species of the genus *Misgurnus* from Korea. Korean J. Zool. **37**: 439-451.

Nei, M. and W. H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 5269-5273.

Raicu, P. and E. Taisescu, 1972. *Misgurnus fossilis*, a tetraploid fish species. J. Heredity **63**: 92-94.

Spolsky, C. and T. Uzzel, 1984. Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. Proc. Natl. Acad. USA, **81**: 5802-5805.

Wilson, G. M., W. K. Thomas and A. T. Beckenbach, 1985. Intra- and interspecific mitochondrial DNA sequence divergence in *Salmo*:Rainboe, steelhead and cuthroat trouts. Can. J. Zool. **63**: 2088 -2094.

Yang, S. Y. and J. H. Kim, 1995. Systematic study on the fishes of the family Cobitidae (Pisces, Cypriniformes) 6. A Study on Mitochondrial DNA RFLP in Korean Cobitid Fish, *Cobitis koreensis*.

B.I.B.S. **16**: 169-174.

Yang, S. Y., H. Y. Lee, H. J. Yang, S. R. Jeon, B. S. Park, and J. H. Kim, 1993. Systematic study on the fishes of the family Cobitidae(Pisces, Cypriniformes). 2. Taxonomic study on the *Cobitis taenia* complex from Korea. Kor. J. Syst. Zool. **9**: 151-170.

RECEIVED: 24 March 1997
ACCEPTED: 15 June 1997

Systematic Study on the Fishes of the Family Cobitidae (Pisces, Cypriniformes) 8. Mitochondrial DNA Differentiation and Taxonomic Status of the *Cobitis taenia* Complex

Jae Heup Kim, Mi Sook Min, Jong Bum Kim and Suh Yung Yang
(Department of Biology, Inha University, Inchon 402-751, Korea)

ABSTRACT

The nucleotide sequence variations of mitochondrial DNA were investigated to estimate the genetic differentiation and to clarify the taxonomic status among the populations of *Cobitis taenia* complex using 10 restriction endonucleases. The estimation of mtDNA size was approximately 17.0 ± 0.5 Kbp. No size variation of mtDNA was detected among the populations of *C. taenia* complex except Miho population of *C. t. lutheri*. The degree of mtDNA sequence divergence between *C. t. taenia* and two other taxa showed interspecific level of difference(p=0.082).

On the other hand, the genetic similarity between *C. t. lutheri* and *C. t. striata* was p=0.033 and this value suggests the subspecific level of differenciation. It is, therefore, concluded that *C. t. taenia* should be classified as a good species and *C. t. lutheri* and *C. t. striata* as subspecies.